

OPTIMASI AMOBILISASI UREASE DARI *Schizosaccharomyces pombe* MENGUNAKAN MATRIK KITOSAN-NATRIUM TRIPOLIFOSFAT

Ivone Fatmawati, Sasangka Prasetyawan*, Anna Roosdiana

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran Malang 65145

*Alamat korespondensi, Tel : +62-341-575838, Fax : +62-341-575835
Email: sasangka@ub.ac.id

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian untuk menentukan kondisi optimum urease yang diamobilisasi dalam kitosan-natrium tripolifosfat. Urease yang digunakan diisolasi dari *Schizosaccharomyces pombe* dan dimurnikan melalui metode pemurnian bertingkat menggunakan amonium sulfat fraksi 30–45%. Urease merupakan enzim yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis urea menjadi ammonia dan karbondioksida. Kondisi optimum amobilisasi urease dipelajari dengan menentukan aktivitas tertinggi pada variasi konsentrasi kitosan (1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5) % w/v dan konsentrasi urease (0,840; 1,680; 2,520; 3,360; 4,200) mg/mL. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi kitosan optimum yaitu 2,5% (w/v) dan konsentrasi urease optimum pada 2,520 mg/mL dengan aktivitas tertinggi sebesar 0,57 Unit.

Kata kunci: aktivitas, kitosan-natrium tripolifosfat, *Schizosaccharomyces pombe*, urease.

ABSTRACT

Determination of optimum condition of immobilized urease using chitosan-sodium tripolyphosphate has been done. Urease was isolated from *Schizosaccharomyces pombe* and was purified through fractional purification method using ammonium sulphate saturation of 30–45%. Urease is an enzyme that has the ability to hydrolyze of urea into carbon dioxide and ammonia. The activity of urease was defined as the amount of micromol ammonia per mL enzyme per minute and resulted ammonia was analyzed by spectrophotometric method using Nessler reagen. The optimum condition of immobilized urease was observed by determining the highest activity in various chitosan concentration (1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5) % w/v and urease concentration (0.840; 1.680; 2.520; 3.360; 4.200) mg/mL. The result of this experiment showed that the optimum chitosan concentration was 2.5% w/v while the optimum urease concentration was 2.520 mg/mL with the highest activity of 0.57 Units.

Key words: activity, chitosan-sodium tripolyphosphate, *Schizosaccharomyces pombe*, urease.

PENDAHULUAN

Enzim merupakan biokatalisator yang dapat mempercepat reaksi kimia dengan cara menurunkan energi aktivasi dari reaksi kimia yang dikatalisnya [1]. Urease merupakan salah satu enzim yang banyak dimanfaatkan sebagai katalisator dalam proses hidrolisis urea menjadi NH_3 dan CO_2 , dan diaplikasikan sebagai biosensor optik urea [2]. Urease dapat

diisolasi dari beraneka ragam organisme, salah satu contohnya *Schizzosaccharomyces pombe* [3]. *Schizzosaccharomyces pombe* termasuk golongan kapang dan merupakan sel haploid [4].

Pada prinsipnya, enzim yang tidak terdenaturasi ketika mengkatalis suatu reaksi kimia dapat digunakan untuk beberapa kali reaksi. Oleh karena itu, pada masa sekarang telah dikembangkan teknik amobilisasi, yaitu suatu teknik yang membatasi pergerakan enzim di dalam matrik tertentu namun masih menampilkan sifat katalitiknya sehingga enzim dapat digunakan secara berulang [5].

Urease dapat diamobilisasi menggunakan metode penjerapakan di dalam kisi polimer alami maupun buatan, contohnya kitosan yang diikatkan silang dengan natrium tripolifosfat. Natrium tripolifosfat merupakan agen pengikat silang yang dapat menghasilkan ion hidroksil dan ion fosfat ketika dilarutkan di dalam air. Kitosan yang terprotonasi akan menghasilkan NH_3^+ sehingga apabila ditambahkan larutan natrium tripolifosfat, akan terjadi ikatan silang antara NH_3^+ dengan ion hidroksil/ion fosfat dari natrium tripolifosfat [6].

Berdasarkan uraian di atas, pada penelitian ini dipelajari lebih lanjut mengenai kondisi optimum amobilisasi urease dari *Schizzosaccharomyces pombe* menggunakan matrik kitosan-natrium tripolifosfat yang meliputi konsentrasi optimum kitosan dan konsentrasi optimum urease.

METODA PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan penelitian yang digunakan adalah kultur murni khamir *Schizzosaccharomyces pombe* yang diperoleh dari Pusat Studi Bioteknologi Universitas Gajah Mada. Bahan-bahan kimia yang digunakan mempunyai derajat kemurnian pro analisis dan *for microbiology*. Bahan kimia dengan kualitas pro analisis antara lain CH_3COOH ($\rho=1,05 \text{ g/cm}^3$), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, HCl (37% w/w; $\rho=1,19 \text{ g/cm}^3$), BaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaOH , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$, NaCO_3 , EDTA, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, CCL_3COOH , HgI_2 , KI, dan kitosan. Bahan kimia dengan kualitas *for microbiology* meliputi agar, dekstrosa, urea, pepton, kasein dan *yeast extract*.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), pH meter (schott-gerate tipe CG-820), inkubator (Heraeus Type B 5042), jarum ose, *magnetik stirrer*, motor rotary (Ikamag RH), spectronic (Genesys), kuvet, oven (Memmert), autoklaf (Tipe LS-C35L), pemanas listrik (Jankle-Kunkel), *shaker*

(Edmund Buhler SM 2524B), *sentrifuse* dingin (Denley), kertas saring Whatman No. 40, *syringe*, kertas saring halus, aluminium foil, kapas, kasa, kantong selofan, bunsen dan pH universal.

Prosedur

Preparasi urease

Inokulum yang mengandung *Schizosaccharomyces pombe* diambil 15 mL kemudian ditumbuhkan dalam 150 mL media pertumbuhan pada temperatur ruang lalu diletakkan di atas *shaker* dan dikocok dengan kecepatan putar 175 rpm pada temperatur ruang selama 2 hari. Selanjutnya, ditambahkan 15 mL buffer asetat pH 5,5 lalu disentrifugasi dingin dengan kecepatan putar 3000 rpm pada temperatur 4°C selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar urease. Setelah itu, dimurnikan dengan metode pengendapan amonium sulfat 30–45% dan dilanjutkan dengan dialisis menggunakan kantong selofan. Urease murni yang diperoleh diuji aktivitas melalui penambahan reagen Nessler dan diuji pula kadar protein enzim melalui penambahan reagen Biuret.

Uji kadar protein

Penentuan kadar protein dilakukan dengan cara memipet 2 mL enzim, lalu ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm, lalu ditambah 2 mL buffer fosfat pH 7 kemudian dikocok dan diinkubasi selama 30 menit pada temperatur ruang. Selanjutnya, diukur absorbansi dari larutan campuran pada panjang gelombang 540 nm. Kadar protein dapat diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar kasein yaitu $y=0,00004x$. Kurva baku dibuat dengan mengukur absorbansi kasein pada konsentrasi 1000–9000 ppm.

Penentuan Aktivitas Urease

Penentuan aktivitas urease dilakukan dengan cara mereaksikan 5 mL larutan urea 0,2 mM lalu ditambah 1 mL urease, kemudian ditambah 1 mL buffer fosfat pH 7, kemudian diinkubasi selama 20 menit pada temperatur 45°C. Selanjutnya, ditambahkan 10 mL CCL_3COOH 8% untuk menghentikan hidrolisis. Lalu, disentrifugasi selama 15 menit. Ammonia hasil reaksi enzimatik diambil 10 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok sampai homogen. Larutan dipipet 10 mL, dipindahkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 0,2 mL reagen Nessler dan dikocok hingga homogen. Kemudian, diukur absorbansi dari kompleks yang terbentuk antara ammonia dan reagen Nessler pada panjang gelombang 400 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh

dikonversikan pada persamaan kurva standar ($y=0,156x$) sehingga dapat diketahui besarnya konsentrasi ammonia hasil hidrolisis urea yang dikatalis dengan urease. Kurva baku dibuat dari pengukuran absorbansi larutan ammonia dengan konsentrasi 1- 4 ppm.

Satu unit aktivitas enzim bebas (U) diartikan sebagai $1\mu\text{mol}$ ammonia yang dihasilkan per menitnya tiap mL enzim. Pada enzim amobil, satu unit aktivitas enzim amobil diartikan sebagai 1 μg ammonia yang dihasilkan per menit per gram enzim amobil.

Preparasi matrik kitosan sebagai media amobilisasi

Padatan kitosan ditimbang dengan massa yang bervariasi yaitu 0,75 ; 1,00 ; 1,25 ; 1,50 ; 1,75 g. Kemudian, dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL yang berbeda-beda, lalu dilarutkan dalam 50 mL CH_3COOH (3% w/v) dan diaduk menggunakan pengaduk magnetik pada temperatur ruang hingga homogen. Larutan kitosan yang dihasilkan memiliki konsentrasi 1,5 ; 2,0 ; 2,5 ; 3,0 dan 3,5 %.

Penentuan konsentrasi kitosan optimum

Amobilisasi urease dengan kitosan-natrium tripolifosfat dilakukan dengan cara mencampurkan 1 mL larutan urease hasil pemurnian ke dalam 4 mL larutan kitosan dengan berbagai konsentrasi (1,5 : 2,0 : 2,5 : 3,0 : 3,5)% di dalam gelas ukur 10 mL. Setelah itu, tiap-tiap larutan campuran dimasukkan ke dalam *syringe* dan ditekan secara perlahan sehingga campuran menetes ke dalam wadah yang berisi 10 mL larutan $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ 3%. Manik-manik yang terbentuk dibiarkan terendam di dalam larutan $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ 3% selama 75 menit. Hasil preparasi disaring menggunakan kertas saring sehingga dihasilkan filtrat dan endapan. Kemudian, filtrat yang diperoleh diuji kadar protein sisanya dan urease amobil yang diperoleh diuji aktivitasnya.

Penentuan konsentrasi urease optimum

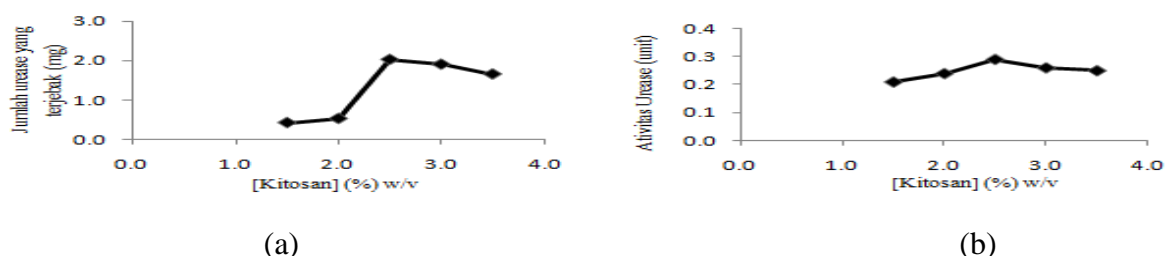
Tahapan amobilisasi pada variasi konsentrasi urease dilakukan seperti langkah amobilisasi variasi konsentrasi kitosan. Penentuan ini dilakukan pada konsentrasi optimum kitosan yang hasilnya diperoleh dari tahapan sebelumnya. Perbedaannya terletak pada jumlah enzim urease hasil pemurnian yang dipipet yaitu (0,2 : 0,4 : 0,6 : 0,8 : 1) mL dan ditambahkan larutan buffer fosfat pH 7 hingga volumenya mencapai 1 mL.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan konsentrasi kitosan optimum

Pada penelitian ini, urease hasil pemurnian menggunakan amonium sulfat fraksi 30-45% mempunyai kadar protein sebesar 4,200 mg/mL dan aktivitas urease bebas sebesar 0,37 Unit. Kitosan yang dilarutkan di dalam asam asetat akan mengalami protonasi pada gugus amina menjadi $(-\text{NH}_3^+)$. Gugus $-\text{NH}_3^+$ dari kitosan akan berikatan secara elektrostatik dengan O^- dari $\text{H}_3\text{P}_3\text{O}_{10}^{2-}$ sehingga terjadi ikatan silang. Dengan demikian, urease akan terjebak di dalam matrik tersebut.

Pada konsentrasi kitosan 1,5% hingga 2,5%, jumlah urease yang terjebak semakin meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi kitosan sedangkan pada konsentrasi kitosan 3% dan 3,5% mengalami penurunan secara signifikan (Gambar 1.a). Hal ini dimungkinkan karena ukuran diameter pori-pori sedikit lebih kecil dan tidak sesuai dengan ukuran molekul enzim, sehingga menyebabkan urease yang terjebak akan terlepas. Nilai aktivitas urease amobil berbanding lurus dengan konsentrasi kitosan dan jumlah urease yang terjebak di dalam matrik kitosan-natrium tripolifosfat. Nilai aktivitas urease pada konsentrasi kitosan 1,5% hingga 2,5% meningkat secara signifikan seiring dengan bertambahnya konsentrasi kitosan sedangkan pada konsentrasi kitosan 3% dan 3,5% terjadi penurunan nilai aktivitas urease amobil (Gambar 1.b). Penurunan aktivitas urease amobil ketika konsentrasi kitosan 3% dan 3,5% disebabkan semakin besar konsentrasi kitosan, maka semakin besar pula kerapatan matrik kitosan-natrium tripolifosfat saat menjebak enzim sehingga akan menyebabkan proses hidrolisis urea menjadi ammonia oleh urease berjalan tidak optimal. Hal ini dimungkinkan karena ukuran molekul urea yang lebih besar daripada matrik kitosan-natrium tripolifosfat, sehingga akan sulit untuk melewati matrik dan mengakibatkan kontak antara sisi aktif enzim teramobil dengan substrat urea menjadi kecil.

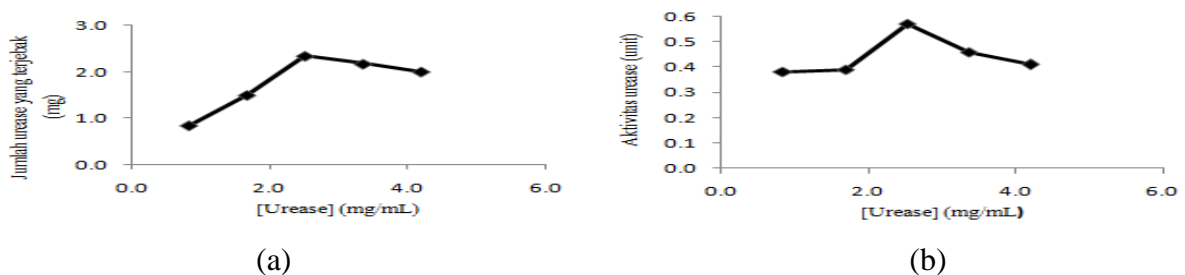


Gambar 1. (a) Pengaruh konsentrasi kitosan terhadap jumlah urease yang terjebak tiap 0,5 gram matrik kitosan-natrium tripolifosfat (b) Pengaruh konsentrasi kitosan terhadap aktivitas urease amobil pada matrik kitosan-natrium tripolifosfat.

Berdasarkan hasil analisis yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa konsentrasi kitosan 2,5% merupakan konsentrasi kitosan optimum untuk menghasilkan jumlah urease yang terjebak paling banyak yaitu 2,020 mg/gram kitosan-natrium tripolifosfat dengan aktivitas maksimum sebesar 0,29 Unit.

Penentuan konsentrasi urease optimum

Amobilisasi enzim dengan metode penjerapakan sangat dipengaruhi oleh konsentrasi enzim. Semakin tinggi konsentrasi enzim maka reaksi enzimatik menjadi semakin meningkat sampai batas tertentu. Pada penelitian ini, konsentrasi kitosan optimum yang digunakan diperoleh dari tahapan sebelumnya, yaitu pada konsentrasi kitosan 2,5%. Dari variasi konsentrasi urease 0,840 mg/mL sampai 4,200 mg/mL diperoleh hasil bahwa pada konsentrasi enzim 0,840 mg/mL hingga 2,520 mg/mL, jumlah urease yang terjebak di dalam matrik kitosan-natrium tripolifosfat mengalami peningkatan tetapi pada konsentrasi enzim 3,360 mg/mL dan 4,200 mg/mL, jumlah urease yang terjebak berkurang secara signifikan (Gambar 2.a). Nilai aktivitas urease amobil mengalami peningkatan sebanding dengan konsentrasi urease dan jumlah urease yang terjebak di dalam matrik kitosan-natrium tripolifosfat. Nilai aktivitas urease pada konsentrasi enzim 0,840 mg/mL hingga 2,520 mg/mL meningkat secara signifikan seiring dengan bertambahnya konsentrasi enzim sedangkan pada konsentrasi enzim 3,360 mg/mL dan 4,200 mg/mL mengalami penurunan nilai aktivitas urease amobil (Gambar 2.b). Penurunan nilai aktivitas tersebut dikarenakan semakin meningkatnya konsentrasi urease akan menyebabkan semakin banyaknya sisi aktif dari enzim yang berikatan pada substrat sehingga mengakibatkan sisi aktif enzim mengalami kerusakan. Kerusakan sisi aktif enzim ini dapat menyebabkan reaksi hidrolisis urea menjadi ammonia mengalami penurunan.



Gambar 2. (a) Pengaruh konsentrasi urease terhadap jumlah urease yang terjebak tiap 0,5 gram matrik kitosan-natrium tripolifosfat (b) Pengaruh konsentrasi urease terhadap aktivitas urease amobil pada matrik kitosan-natrium tripolifosfat.

Berdasarkan hasil analisis yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa konsentrasi urease 2,520 mg/mL merupakan konsentrasi urease optimum untuk menghasilkan jumlah urease yang terjebak paling banyak yaitu 2,340 mg/gram kitosan-natrium tripolifosfat dengan aktivitas maksimum sebesar 0,57 Unit.

KESIMPULAN

Konsentrasi larutan kitosan dan konsentrasi urease berpengaruh terhadap jumlah urease yang terjebak dan aktivitas urease. Kondisi optimum amobilisasi urease didapat pada konsentrasi larutan kitosan 2,5% dan konsentrasi urease 2,520 mg/mL dengan jumlah enzim terjebak yaitu 2,340 mg/gram kitosan-natrium tripolifosfat dan aktivitas sebesar 0,57 Unit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Sasangka Prasetywan, MS dan Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc atas bimbingan dan arahan dalam penelitian ini serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebut satu per satu.

DAFTAR PUSTAKA

1. Poedjiadi A. dan Supriyanti F. M. T., 2006, *Dasar-Dasar Biokimia*, Jakarta, UI-Press.
2. Fauziyah B., 2012, Optimasi Parameter Analitik Biosensor Urea Berbasis Immobilisasi Urease dalam Membran Polianilin, *Saintis*, Vol. 1.
3. Mulyasuryani, Ani., Anna Roosdiana dan Arie Srihardyastutie, 2010, The Potentiometric Urea Biosensors Using Chitosan Membrane, *Indo. J. Chem* 10(2), 162-166.
4. Forsburg S.L., 2005, The Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* : Models for Cell Biology Research, *Gravitational and Space Biology*, 18(2).
5. Chibata I., 1978, *Imobilized Enzyme, Research and Development*, New York, John Wiley and Sons Inc.
6. Bhumkar D.R. dan V.B. Pokharkar, 2006, Studies on Effect of pH on Cross-linking of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate : A Technical Note, *AAPS PharmSciTech* 7(2) Article 50.